

DDTによる肝臓脂質蓄積抑制に及ぼす食餌米糠水可溶物、 フィチン酸およびミオイノシトールの効果

岡崎 由佳子, 片山 徹之

(広島大学大学院教育学研究科*)

Effects of dietary water-soluble rice bran, phytic acid and myo-inositol on prevention of fatty liver in rats fed DDT.

Yukako OKAZAKI and Tetsuyuki KATAYAMA

*Department of Human Life Sciences Education, Graduate School of Education,
Hiroshima University, 1-1-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8524, Japan*

Summary

We have previously shown that dietary myo-inositol and phytic acid similarly depressed the increases in hepatic lipids and lipogenic enzymes activities in rats fed 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT). The present study was conducted to investigate whether dietary water-soluble rice bran, which contains 27.8% phytic acid, would also have an anti-fatty liver function. As well as dietary 1.02% sodium phytate and the equimolar myo-inositol (0.2%), dietary 1.7% water-soluble rice bran, which contains the similar level of phytic acid to 1.02% sodium phytate, generally reduced the hepatic lipids and lipogenic enzymes activities. They enhanced the rises in hepatic activity of phase II drug-metabolizing enzyme, glutathione S-transferase, in rats fed DDT. On the other hand, dietary water-soluble rice bran reduced hepatic cytochrome P-450 content, while dietary phytic acid and myo-inositol had no effect on it in rats fed DDT. The present study suggests that dietary water-soluble rice bran, in addition to the functions of phytic acid, has additional functions.

はじめに

DDT, PCBおよびダイオキシンといった環境汚染物質の多くは、自然界では分解されにくい脂溶性低分子有機化合物であり、現在も我々の環境中に残留し続けている物質である。これら環境汚染物質が食物連鎖を通して濃縮され、ある程度生体内に取り入れられている状況を考慮した場合、栄養学的観点より対策を検討する必要があると考えられる。環境汚染物質を実験動物に摂取させた場合、近年問題視されている性ホルモン攪乱作用のほかにも、脂肪肝の生成、血清コレステロールの上昇、過酸化脂質の増大および薬物代謝酵素活性の上昇等、栄養学的にも興味深い現象が知られている¹⁾。

一方、ビタミン様物質であるミオイノシトールは、古くから抗脂肪肝作用があることが知られている。また、フィチン酸は、ミオイノシトールに6個のリン酸基が結合したミオイノシトール1,2,3,4,5,6-六リン酸であり、穀類や豆類に1~3%含まれている。1941年Woolleyは、イノシトールとフィチン（フィチン酸のカリウム塩とマグネシウム塩の混合物）がマウスの脱毛症（alopecia）や成長遅延に効果があることを述べている²⁾が、現在そのような認識はほとんどもたれておらず、フィチン酸はリン酸基に起因するキレート能により無機質の小腸からの吸収を抑制するため一般的に抗

*所在地：広島県東広島市鏡山1-1-1（〒739-8524）

栄養因子と呼ばれている。現在のフィチン酸に関する栄養学的研究の多くは、無機質吸収抑制作用も含めてこのリン酸基の作用に着目したものであり、基本骨格であるミオイノシトールとの共通性に着目した研究は、ほとんど行われていない。これまでに著者らは、ミオイノシトールとフィチン酸の化学構造の共通性に着目し、これらが共通して環境汚染物質摂取により生じた脂肪肝を抑制し、その機構には脂肪酸合成系の抑制が関与する可能性があることを明らかにした^{3, 4)}。さらに、これまでの著者らの研究結果を考え合わせ、フィチン酸がビタミン様物質であるミオイノシトールの前駆体、あるいはビタミン様物質そのものとして機能するのではないかという仮説を提唱した⁵⁾。

他、フィチン酸を含有する米糠は、脂溶性部分は米油として利用されているが、水溶性成分は利用方法が確立されていないため廃棄されている。米糠水可溶物は、米油製造過程で生じた脱脂米糠から酸抽出、濃縮乾燥された粉末であり、高濃度のフィチン酸を含有している。米糠水可溶物は、その他にも糖質、粗タンパク質、無機質および水溶性ビタミン等を含んでおり、この有効利用を考えることは栄養学的のみならず環境学的にも重要と考えられる。

したがって本研究では、米糠水可溶物が、環境汚染物質の一つである DDT 摂取による脂肪肝生成に対して、フィチン酸と同様の抑制効果を発揮し、且つ他の栄養素の供給源となりうるのではないかと考え、薬物代謝酵素活性への影響とあわせて検討を加えた。

実験方法

実験飼料に用いたフィチン酸ナトリウムおよびミオイノシトールは、築野食品工業(株)より提供を受けた。米糠水可溶物は築野食品工業(株)により製造されているものを用いた (Table 1)。DDT は東京化成工業株式会社より購入した。実験動物として、初体重 57~70g の Wistar 系雄ラット (広島実験動物(株)) を用いた。ラットは、ステンレスケージに 1 匹ずつ入れ飼育し、飼育室は 12 時間明暗サイクル (8:00~20:00) とし、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温に保った。市販の固形飼料 (オリエンタル酵母工業(株)) で 3 日間予備飼育した後、各群の平均体重がほぼ等しくなるように、1 群 5 匹ずつの 5 群に分けた。基本食の組成 (g/kg diet) は Table 2 に示す。DDT 添加食群には、0.7 g/kg diet の DDT をショ糖に置き換えて添加した。フィチン酸およびミオイノシトール添加食群には、等モルとなるように、フィチン酸ナトリウム 10.2

Table 1 Composition of water-soluble rice bran

Composition	(%)
Carbohydrate	41.2
Crude protein	8.2
Ash	8.2
Water-soluble vitamins	0.02
Phytic acid	27.8

Table 2 Composition of the experimental diets

Ingredient	Control (g/kg)	DDT (g/kg)
Casein	200	200
DL-Methionine	3	3
Sucrose	503	502.3
Potato starch	150	150
Corn oil	50	50
Cellulose Powder	50	50
Mineral mixture ¹	35	35
Vitamin mixture	10	10
DDT	-	0.7

¹AIN-93: J. Nutr., 123, 1939-1951 (1993)
water-soluble rice bran: 17g/kg
myo-inositol: 2g/kg
sodium phytate: 10.2g/kg

g/kg dietとミオイノシトール2 g/kg dietを、米糠水可溶物添加食群には、フィチン酸添加食群と同量のフィチン酸を含有するように、17 g/kg dietの米糠水可溶物をそれぞれショ糖に置き換えてDDT添加食に加えた。餌と水は自由摂取とし、2週間飼育した。飼育終了後、エーテル麻酔下で心臓採血により屠殺し、採取した血液から血清を得た。肝臓をすばやく取り出して一部を切り取り、4倍量の1.15%塩化カリウム溶液でホモゲナイズした後、10,000 × g(4℃)で10分間遠心した。遠心後、上清3 mlに32 mM塩化カルシウム溶液1 mlを加えて混合し、25,000 × g(4℃)で15分間遠心した⁶⁾。このときのペレットを1.15%塩化カリウム溶液でホモゲナイズした後、グリセロール（最終濃度20%）と混合し、薬物代謝系Phase I酵素であるチトクロームP-450測定用のマイクロソーム画分とした。残りの10,000 × g上清は、105,000 × gで60分間遠心し、その上清を脂肪酸合成関連酵素活性および薬物代謝系のPhase II酵素であるグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）活性測定用のサイトゾール画分とした。血清と採取した各画分および残りの肝臓は-80℃で冷凍保存した。

肝臓脂質は、Folchらの方法⁷⁾で抽出した。肝臓総脂質は重量法で測定した。肝臓および血清トリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質は、それぞれ市販のキット（和光純薬工業株）を用いて測定した。肝臓の脂肪酸合成関連酵素であるリンゴ酸酵素（ME）とグルコース6-リン酸脱水素酵素（G6PD）活性値は、Freedlandの方法⁸⁾を用いて、NADPのNADPHへの変換による340 nmの吸収増大を測定して求めた。肝臓のチトクロームP-450含量は、Omura and Satoの方法⁹⁾を用いて測定した。GST活性は、Habigらの方法¹⁰⁾で測定し、基質として1-chloro-2,4-dinitrobenzeneを用いた。肝臓の過酸化脂質の定量は、Masugi and NakashimaによるThiobarbituric acid reactive substances (TBARS)法¹¹⁾で測定した。マイクロソームおよびサイトゾールのタンパク質は、Lowryらの方法¹²⁾により測定した。

統計処理は一次元分散分析を行った後、Duncan's multiple range testを行い、危険率5%以下を有意とした¹³⁾。

実験結果

すべての実験結果をTable3に示す。体重増加量は、本食餌組成による影響を受けなかった。肝臓重量は、DDT添加食群において顕著に増加した。食餌フィチン酸はこの増加を抑制する傾向を示し、米糠水溶性添加食群においても同様の傾向が認められた。ミオイノシトール添加食群において、DDT摂取による肝臓重量の増加は有意に抑制された。

肝臓の総脂質およびトリグリセリドは、DDT摂取により顕著に増加し、この増加は食餌フィチン酸、ミオイノシトールおよび米糠水可溶物により同様に有意に抑制された。肝臓のコレステロールもDDT摂取により増加し、この増加は食餌ミオイノシトール、フィチン酸および米糠水可溶物により抑制された。肝臓のリン脂質含量はg肝臓当たりで示した場合にDDT摂取により増加する傾向を示し、100 g体重当たりで表した場合、有意に増加したが食餌フィチン酸、ミオイノシトールおよび米糠水可溶物による顕著な影響は認められなかった。血清コレステロールおよびトリグリセリドについては本実験の食餌操作による顕著な影響は認められなかった。血清リン脂質含量はDDT摂取により有意に増加したが、食餌フィチン酸、ミオイノシトールおよび米糠水可溶物による効果は認められなかった。肝臓の脂肪酸合成関連酵素であるグルコース6-リン酸脱水素酵素活性はmgタンパク質当たりで示した場合、DDTによる影響は認められなかったが、食餌フィチン酸で有意に抑制され、米糠水可溶物およびミオイノシトールにより抑制される傾向を示した。グルコース6-リン酸脱水素酵素活性を100 g体重当たりで示した場合、DDT摂取により有意に増加し、この増加は米糠水可溶物、フィチン酸およびミオイノシトールにより抑制された。リンゴ酸酵素活性についてはmgタンパク質当たりで示した場合に各群間に有意な差は認められなかった。100 g体重当たりで示した場合、この酵素活性はDDT摂取により有意に増加したが、食餌ミオイノシトールにより抑制される傾向が認められた。

肝臓のチトクロームP-450含量はDDT摂取により顕著に増加し、この増加は米糠水可溶物により緩和された。食餌フィチン酸およびミオイノシトールによる有意な影響は認められなかった。肝臓のGST活性はDDT摂取により顕著に増加し、この増加は食餌米糠水可溶物、フィチン酸およびミオイノシトールにより促進される傾向を示した。肝臓のTBARSはDDT摂取により顕著に増加したが、米糠水可溶物、フィチン酸およびミオイノシトールによる抑制効果は認められなかった。

Table 3 Effects of dietary addition of water-soluble rice bran, sodium phytate and myo-inositol on liver and serum lipid status and hepatic drug-metabolizing enzymes in rats fed 0.07% DDT

	Control	DDT	DDT +WSRB	DDT +Phytate	DDT +myo-inositol	Pooled SEM
Gains in body weight (g/14days)	113	112	110	109	111	3
Liver weight (g/100g body wt.)	4.91 ^a	8.03 ^c	7.21 ^{bc}	7.66 ^{bc}	6.95 ^b	0.33
<i>Hepatic lipids</i>						
Total lipids (mg/g tissue)	65.7 ^a	167.9 ^c	112.5 ^b	111.3 ^b	102.4 ^{ab}	13.1
Triglyceride (μ mol/g tissue)	30.6 ^a	103.9 ^b	53.4 ^a	62.1 ^a	41.3 ^a	12.1
Cholesterol (μ mol/g tissue)	9.4 ^a	17.7 ^c	15.7 ^c	14.8 ^{bc}	12.0 ^{ab}	1.0
Phospholipids (μ mol/g tissue)	37.2 ^a	48.8 ^{ab}	45.3 ^{ab}	55.1 ^b	42.5 ^{ab}	3.5
<i>Serum lipids</i>						
Triglyceride (mmol/L)	0.97	1.13	1.03	1.08	0.92	0.152
Cholesterol (mmol/L)	1.63	1.86	1.54	1.99	1.90	0.137
Phospholipids (mmol/L)	4.14 ^a	4.84 ^b	4.85 ^b	5.21 ^b	5.06 ^b	0.18
<i>Hepatic lipogenic enzymes</i>						
G6PD (mU/mg protein)	106.6 ^c	99.5 ^{bc}	70.6 ^{ab}	55.9 ^a	68.7 ^{ab}	10.0
(U/100g body wt.)	28.1 ^a	42.1 ^b	28.2 ^a	23.4 ^a	26.2 ^a	3.7
ME (mU/mg protein)	69.7	93.5	94.7	73.4	76.3	7.0
(U/100g body wt.)	18.5 ^a	40.0 ^b	38.1 ^b	30.7 ^b	29.7 ^{ab}	3.4
<i>Hepatic drug-metabolizing enzymes</i>						
Cytochrome P-450						
(nmol/mg protein)	0.199 ^a	0.520 ^c	0.405 ^b	0.479 ^{bc}	0.581 ^c	0.033
GST (mU/mg protein)	899 ^a	1462 ^b	1683 ^b	1632 ^b	1704 ^b	77
Liver TBARS (^A 532/g tissue)	3.39 ^a	7.50 ^b	7.85 ^b	6.93 ^b	6.95 ^b	0.57

Values are means and Pooled SEM. Within a column, values followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

WSRB; Water-soluble rice bran. ^A532; absorbance at 532nm.

考 察

これまでの著者らの結果とはほぼ一致して^{3, 4)}, DDT摂取による肝臓脂質含量, 体重当たりで補正したグルコース6-リン酸脱水素酵素およびリンゴ酸酵素活性の増加は食餌ミオイノシトールおよびフィチン酸により抑制あるいは抑制される傾向を示した。さらに, 食餌米糠水可溶物もほぼ同様な傾向を示した。このことはフィチン酸を単独に添加した場合と同様, 食品中のフィチン酸が脂肪肝の生成を抑制していると考えられる。近年食品の機能を説明する場合にその食品に含有される単一成分の機能性が強調され, その成分が抽出され有効利用されている。しかし, 食品は五大栄養素をはじめとする様々な成分を含有する混合成分であり, 成分間の相互作用を考慮しながら, 単一成分の機能性を考える必要があろう。

肝臓の薬物代謝酵素については解毒作用と関連の深いPhase II酵素であるGST活性のDDT摂取による増加が, 食餌フィチン酸, ミオイノシトールおよび米糠水可溶物により促進される傾向にあった。食餌フィチン酸やミオイノシトールによるこの効果は以前の我々の結果^{3, 4)}と一致するものであるが, ここでも米糠水可溶物中のフィチン酸が効果を示したと考えられる。一方, 活性酸素の産生と関連があり, その増加が必ずしも好ましいとはいえない肝臓のチトクロームP-450含量は, DDT摂取下において米糠水可溶物により有意に抑制された。この現象は米糠水可溶物がフィチン酸の有する効果を示しつつ, さらに付加的な効果を有する可能性を示している。著者らはこれまでに, この米糠水可溶物¹⁴⁾や大豆ホエー¹⁵⁾のようなフィチン酸含有成分が, 抗酸化作用を指標とした場合に単一のフィチン酸よりも優れていることを明らかとした。もちろん, 単離・精製された単一成分の機能は一般的には食品のような混合成分中にある場合と比較して強力であろうし, 添加すればその機能を直ちに発揮する可能性があろう。薬剤と異なる食品の機能性について考える場合には, ある機能性成分に注視するのみでなく, それを取り巻く成分との関係や相互作用についても考えることが, 新しい機能性の開発にもつながるのではあるまいか。

フィチン酸がある程度吸収され、ミオイノシトールあるいはミオイノシトール-リン酸として体内に出現することがラジオアイソトープを使用した実験で示されている¹⁶⁾。最近、食餌中にフィチン酸を添加すると等モルのミオイノシトールを添加した場合とほぼ同様に肝臓中のミオイノシトール含量が増加することも明らかとなっている（岡崎，未発表）。したがって著者らは、フィチン酸による抗脂肪肝作用はフィチン酸が体内でミオイノシトールに変換されて発揮されるのではないかと推定している。一方、これまで穀類や豆類のような植物性食品に多く含有されることが知られていたフィチン酸が哺乳動物の組織中にも含まれており¹⁷⁾、食餌中にフィチン酸を添加すると肝臓や脳などの組織中でフィチン酸含量も増加することが明らかとなってきている¹⁸⁾。また、脳にフィチン酸結合タンパク質が存在し、動物体内でフィチン酸が重要な生理的機能を有する可能性なども考えられている¹⁹⁾。現在、ミオイノシトールやフィチン酸の抗脂肪肝作用とミオイノシトールおよびフィチン酸代謝の関係について検討中である。

参考文献

- 1) Oda H, Yamashita K, Sasaki S, Horio F, Yoshida A (1987) Long-term effects of dietary polychlorinated biphenyls and high level of vitamin E on ascorbic acid, and lipid metabolism in rats. *J Nutr* 117: 1217-1223.
- 2) Woolley DW (1941) Identification of the mouse antialopecia. *J Biol Chem* 139: 29-34.
- 3) Okazaki Y, Katayama T (2003) Effects of dietary carbohydrate and myo-inositol on metabolic changes in rats fed 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT). *J Nutr Biochem* 14: 81-89.
- 4) Okazaki Y, Kayashima T, Katayama T (2003) Effect of dietary phytic acid on hepatic activities of lipogenic and drug-metabolizing enzymes in rats fed 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane (DDT). *Nutr Res* 23: 1089-1096.
- 5) 岡崎由佳子, 片山徹之 (2005) フィチン酸の栄養的再評価－ミオイノシトールとの共通性を中心に－. *日本栄養・食糧学会誌* 58: 151-156.
- 6) Schenkman JB, Cinti DL (1987) Preparation of microsomes with calcium. *Method in Enzymology* 52: 83-89.
- 7) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- 8) Freedland RA (1967) Effect of progressive starvation on rat liver enzymes activities. *J Nutr* 91: 489-495.
- 9) Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239: 2370-2378.
- 10) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- 11) Masugi F, Nakamura T (1977) Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulphate, and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamins (Japan)* 51: 21-29.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- 13) Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-6.
- 14) 片山徹之, 山下こずえ, 岡崎由佳子 (2002) 水溶性米糠混合成分の機能とフィチン酸－混合成分機能性の概念－. *食品加工技術* 22: 31-38.
- 15) 岡崎由佳子, 片山徹之 (2004) 大豆ホエーおよびその分画物の抗酸化作用. *日本家政学会誌* 55: 957-965.
- 16) Sakamoto K, Vucenic I, Shamsuddin AM (1993) [³H]Phytic acid (Inositol hexaphosphate) is absorbed and distributed to various tissues in rats. *J Nutr* 123: 713-720.
- 17) Szwergold BS, Graham RA, Brown TR (1987) Observation of inositol pentakis- and hexakis-phosphates in mammalian tissues by ³¹P NMR. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 874-881.

- 18) Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Phytate levels in diverse rat tissues: Influence of dietary phytate. *Br J Nutr* 86: 225-231.
- 19) Voglmaier SM, Keen JH, Murphy JE, Ferris CD, Prestwich GD, Snyder SH, Theibert AB. (1992) Inositol hexakisphosphate receptor identified as the clathrin assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 158-163.